ヘリコバクター・ピロリの持続感染機構の研究

—酵素化学, 分子遺伝学から病原微生物学へ—

中 澤 晶 子

山口大学医学部
〒755-8500 宇部市南小串1-1-1

〔受理：2001年9月3日〕

私は共同研究者と共に、ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼ遺伝子を特異的に破壊し、欠損株は胃内に定着できないことを、ヌードマウス感染モデルを用いて証明した。また本菌が尿素走化性と炭酸水素イオン走化性を持つこと、運動は粘液中で亢進すること、粘液中での運動にはウレアーゼが必要であることを明らかにした。さらにウレアーゼオペロンの転写産物解析により、酵素活性化の最終段階で働く蛋白遺伝子 mRNA が、中性で分解され酸性で安定化されることを明らかにした。これらの成績から私は、ヘリコバクター・ピロリの持続感染機構として、胃粘膜細胞表層の中性領域で分裂したウレアーゼ活性が低い細菌が、粘膜表層から遊離し胃酸に曝露されると、ウレアーゼが活性化されて酸を中和できること、粘液層の細菌は、尿素走化性と炭酸水素イオン走化性によって粘膜表層に回帰し、再び分裂するというライフサイクルモデルを提唱した。

はじめに

20世紀後半は生命科学が飛躍的に進展した時代であった。すべての生命現象を DNA 構造から解明しようとする試みは、個別の遺伝子の解析から微生物の全ゲノム配列決定へとすすみ、ついに2001年、ヒトゲノムの全塩基配列決定に至った。これは、直接的には1990年代の全自動配列決定装置や PCR 法など技術の発達に負うところが大きいですが、真に重要なのは、それまでの下等生物の膨大な遺伝子研究の蓄積である。とりわけ大腸菌をはじめとする細菌の研究成果は、ヒトゲノムの DNA 塩基配列を、単なる ATGC 配列ではなく、

生命情報として解読することを可能とした。

私は1962年から1970年まで京都大学医学部で酵素化学を学び、1968年から2年間の米国留学ののち、1971年から順天堂大学、続いて1978年から2000年まで山口大学で生化学と細菌学の教育と研究に従事した。1970年代は遺伝子クローニング技術の創生期であり、大腸菌以外の微生物の遺伝子クローニングはまだほとんど行われていなかったが、私は極めて早い時期にシュードモナス属細菌の遺伝子クローニングに成功し、遺伝子発現調節機構の解明に貢献した。その後1987年にヘリコバクター・ピロリと出会い、今回浅川賞の受賞対象となった「ヘリコバクター・ピロリの持続感染機構」の研究を行った。

私がヘリコバクター・ピロリに出会った当時は、分子遺伝学的研究手法をこの培養困難な細菌に適用することは不可能なように思われた。しかし1995年 TIGR (The Institute of Genome

Teruko NAKAZAWA
Studies on the Mechanism of Persistent Infection of
Helicobacter pylori
Yamaguchi University School of Medicine, Ube City,
Minami-Kogushi 1-1-1

Research) のグループからインフルエンザ菌の全ゲノム配列が報告されてのち、事情は一変した。培養困難な細菌ゲノムが次々と配列決定された。ゲノム配列から細菌の性質を解析する時代となった。ゲノム生物学時代の到来である。ヘリコバクター・ピロリについても1997年に配列決定されたが、これは感染の場における微生物の動態を理解するうえで決定的に重要な情報を提供した。

本論文では、はじめに私の研究の背景として酸素添加酵素の研究ならびにシュードモナス属細菌の遺伝子発現調節機構の研究を紹介し、最後にヘリコバクター・ピロリの持続感染機構の研究を紹介した。

1. 研究の背景—酵素化学

私は1962年に京都大学医学研究科大学院に入學し、酸素添加酵素の発見者である早石 修(京都大学名誉教授、大阪バイオサイエンス名誉所長)の主宰する医化学教室に入った。沼 正作(京都大学教授、故人)より酵素化学の基礎を学んだのち(75)、野崎光洋(滋賀医科大学名誉教授)の指導のもとにシュードモナス属細菌由来の芳香族酸素添加酵素における非ヘム鉄の役割を研究した。安息香酸に O_2 の2原子の酸素を添加してベンゼン環を開裂する酵素(2原子酸素添加酵素)には、*cis*, *cis*-ムコン酸を生成するピロカテカーゼ(カテコール1,2-ジオキシゲナーゼ, C12O)と黄色の2-オキシムコン酸セミアルデヒドを生成するメタピロカテカーゼ(カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ, C23O)がある。C23Oの反応には酵素結合性非ヘム鉄(2価鉄)が必須であることが報告されていたが、C12Oの反応における鉄の荷電状態と役割は不明であった。当時酵素内の重金属の荷電状態を直接測定する方法として電子スピン共鳴装置が知られていた。私は大阪大学の山野俊雄(大阪大学名誉教授)の指導により、C12OとC23Oの鉄を測定し、C23Oは2価鉄、C12Oは3価鉄を持つことを明らかにした。またC12Oの鉄は、無酸素下でカテコールを加えると3価鉄から2価鉄に還元され、酸素と反応させると3価鉄に戻ることを世界ではじめて証明した(67)。

C12Oの3価鉄が酵素活性に必須であることの証明として、1) 活性型酵素は3価鉄をもつこと、2) それを鉄キレート剤で除去すると活性が失われること、3) そこに2価鉄を加えて酵素と結合させたのち酸素に触れさせると活性型の3価鉄酵素が得られることを明らかにした(68, 93)。またこれに関連したC12O, C23Oの研究にも協力した(34, 51, 74)。

1原子酸素添加酵素(O_2 の1原子を基質に添加する)であるリジン酸素添加酵素は、L-リジンから α -アミノバレリアン酸を生成する。ところが、L-オルニチンを基質とすると酸素添加反応ではなく酸化反応を触媒することを見出した。これは酸素添加反応の部分反応として位置付けられ、反応機構解明のうえで重要な発見となった(60, 97)。

私は1968年から1970年までの約2年間、ジョンス・ホプキンス大学生物学科 Roseman 研究室に留学し、生体膜機能の生化学的研究に従事した。S. Rosemanは大腸菌におけるブドウ糖の膜透過機構として、ホスホエノールピルビン酸(PEP)の高エネルギー燐酸結合を利用したPEP-ホスホトランスフェラーゼ系(PEP-PTS系)を発見し、各種細菌の糖透過系について研究を広げつつあった。私はR. Simoni(スタンフォード大学教授)とともにブドウ球菌の乳糖透過系の研究を行った(69, 81, 82)。

2. シュードモナス属細菌の遺伝子発現調節機構

1) シュードモナス・プチダ *mt-2* 株と TOL プラスミド

1971年から順天堂大学医学部細菌学講座の横田 健(順天堂大学名誉教授)のもとで研究することになり、大腸菌のアラビノースイソメラーゼの誘導合成におけるサイクリックAMPの役割を解析した(71)。サイクリックAMP欠損変異菌を用いた酵素誘導の研究を発展させ、シュードモナス菌における酵素誘導機構の研究を開始した。そこではじめて、酵素材料である細菌が、実は大変興味ある研究対象であることに気づき、微生物実験の面白さに心躍らせる毎日がはじまった。

酵素誘導の研究のためには、変異菌を簡便に選択できることが重要である。C23Oの酵素材源であ

るシュードモナス・プチダ mt-2 株は、安息香酸添加培地で黄色の集落を形成する。これは黄色の代謝中間体である 2-オキシムコン酸セミアルデヒド (C23O の産物) が蓄積されるためである。mt-2 株を変異剤処理し、安息香酸添加培地で無色の集落を調べたところ、自然突然変異で予測されるよりもはるかに高頻度に変異菌が出現した。しかもそれらは C23O 活性のみでなく、C23O の産物を分解する酵素も欠損していた。ところが不思議なことに、これらの変異菌はなお安息香酸培地で発育できる。更に研究を進め、mt-2 株が安息香酸代謝経路として、メタ開裂経路 (安息香酸 → カテコール → 2-オキシムコン酸セミアルデヒド → TCA サイクル) とオルト開裂経路 (安息香酸 → カテコール → *cis*, *cis*-ムコン酸 → TCA サイクル) を併せ持つことを明らかにした (72)。

1972年に米国の A. Chakrabarty らはサリチル酸分解経路の酵素の遺伝子群がプラスミド上に存在することを報告し、このようなプラスミドを分解プラスミドと呼んだ。私はメタ開裂経路の C23O 酵素の遺伝子もプラスミド上に存在することを接合伝達実験で証明し、1973年に日本細菌学会で報告した。ところが1974年に、英国の P. Williams らは mt-2 株を入手し、C23O をはじめとする一連の酵素遺伝子群がプラスミドに支配されていることを遺伝学的に証明し、TOL プラスミドと命名した。また彼らは、mt-2 が *m*-トルイル酸を唯一の炭素源とする培地に発育可能であるが、プラスミド脱落株は安息香酸培地にしか発育できないことを報告した。続いて私は TOL プラスミドの接合伝達法を確立した (73)。

2) RP4-TOL ハイブリッドの分離

1970年代後半は大腸菌における遺伝子組換え実験法が進展し、微生物遺伝学から分子遺伝学への転換が始まっていた。しかしながらシュードモナス菌を含め腸内細菌以外の細菌における遺伝子組換え実験は遅々として進まなかった。サイズが大きくコピー数も少ない TOL プラスミドをシュードモナス・プチダから分離し解析することはほとんど不可能に思われたので、大腸菌へ接合伝達する方策を考えた。

TOL プラスミドは、大腸菌へは接合伝達できないが、近縁種である緑膿菌へは伝達できる。

TOL プラスミドを保持する緑膿菌を43°Cで培養すると、複製が温度感受性の TOL プラスミドは脱落し *m*-トルイル酸培地に発育できない (52)。もし TOL プラスミドを43°Cでも複製可能なレプリコンに組み込むことができれば、高温で *m*-トルイル酸培地に発育できるはずである。そのためのレプリコンとして、広宿主域プラスミド RP4 を用いることにした。緑膿菌で2つのプラスミドのハイブリッドを作成し、大腸菌に接合伝達するという戦略であった。実験の結果、RP4-TOL ハイブリッドプラスミドを保持する大腸菌クローンを分離することができた。ところがプラスミド DNA の制限酵素切断地図ならびにヘテロデュプレックス解析の結果、予想に反して TOL プラスミド全体ではなく分解酵素遺伝子群のみが RP4 レプリコンに転移していることがわかった (59)。後に津田らは TOL プラスミド上の分解系遺伝子群がトランスポゾンとして存在することを明らかにした。なお順天堂大学時代には、シュードモナス・テストステロニのフタル酸分解経路の研究や緑膿菌のプロトカテキン酸分解経路の研究も行った (40, 57, 58)。

3) TOL プラスミドの構造解析

私は1978年に山口大学医学部第2生化学講座へ移り、中澤 淳 (山口大学名誉教授、東亜大学教授) のもとで大腸菌コリシン E1 プラスミドの構造解析と遺伝子発現調節機構の研究に参加した (8, 9, 10, 32, 78, 94)。また井上幸江 (山口大学医学部講師) らとともに、RP4-TOL プラスミドを用いた遺伝子発現制御機構の研究に着手した。

英国の P. Williams らならびに P. Broda らにより、TOL プラスミド上にはキシレンからトルイル酸までの分解をつかさどる酵素遺伝子群 (第1オペロン) と、トルイル酸からメチルカテコールを経てアセト酢酸とピルビン酸への完全分解をつかさどる酵素遺伝子群 (第2オペロン) が隣り合っていること、および酵素遺伝子に隣接して調節遺伝子が存在することが報告された。われわれは RP4-TOL の各種 *in vivo* 欠失変異株を用いてキシレン分解系の遺伝子地図を作成し (62)、各オペロンの調節機構解析のため、第1オペロンのベンジルアルコール脱水素酵素遺伝子

xylB, 第2オペロンのC230遺伝子*xylE*を大腸菌でクローニングした(18)。その後滋賀医科大学の野崎, 中井らと共同で*xylE*と*catA*(C120の遺伝子)の塩基配列を決定した(45, 46, 47, 48)。

4) 遺伝子発現調節機構

*xylE*を保持する大腸菌の集落にカテコール溶液を噴霧すると, 黄色の程度から遺伝子発現, すなわちプロモーターの強度を推測することができる。この遺伝子を第1オペロンと第2オペロンのオペレーター・プロモーター領域(それぞれOP1とOP2)の下流に連結してpBR322に挿入しレポータープラスミドとした。これを用いてTOL領域の各種DNA断片をpACYC184に挿入して作成したライブラリーを検索し, OP1の発現にはたらく正の調節遺伝子*xylR*と, OP2の発現にはたらく正の調節遺伝子*xylS*のクローニングに成功した(19, 20)。また調節因子XylRはキシレンによって, XylSはトルイル酸や安息香酸によって活性化されることも明らかとなった。奇妙なことに, OP2の発現にはXylSのみでなくXylRも必要であることがわかった(20)。これらの解析は大腸菌で行われたものであり, シュードモナスでは異なる可能性があったが, RP4-TOLプラスミドを大腸菌とシュードモナス・プチダで解析した結果, 大腸菌でもシュードモナスと同様に酵素誘導が見られることが確認された(63)。

シュードモナス菌におけるプロモーター構造が, モデル生物である大腸菌とどのように異なるのか興味を持たれた。そこで逆転写酵素を用いたプライマー伸長法とS1マッピング法により, OP1, OP2の転写開始点とその上流の塩基配列をそれぞれ決定した(16, 21)。RP4-TOLを保持する大腸菌とシュードモナス・プチダを安息香酸添加培地で培養し, mRNAを分離して調べた結果, 転写開始点は全く同じであった。このことから, 両菌のRNAポリメラーゼは同じプロモーター構造を認識すること, および両菌におけるXylRとXylSの転写活性化機構は共通であると結論された(61)。さらに*xylS*と*xylR*についても, 転写開始点と遺伝子産物の同定を行い(22, 23), TOLプラスミド上の遺伝子発現調節

に関わるすべてのプロモーターの構造と転写発現調節因子の構造を決定することができた。

*xylR*とOP2プロモーターには-10, -35コンセンサス配列が認められることから, σ^{70} -RNAポリメラーゼにより転写されると考えられたが, OP1と*xylS*の転写開始点上流にはそのようなコンセンサス配列は認められなかった。そのときクレブシエラの窒素固定の研究を行っていた英国のR. Dixonが, OP1に σ^{54} -RNAポリメラーゼの認識配列であるGG(-24), GC(-12)配列があることを指摘し, われわれが作成したOP1と*xylR*のクローンを用いて, 大腸菌の*rpoN*変異菌では遺伝子発現がみられないことを証明した。ついでわれわれは, *xylS*の発現がXylRとキシレンにより活性化されること, *xylS*プロモーター上流とOP1には, -140を中心とした共通のパリンドローム構造が存在することを見出した(24)。また*xylR*の塩基配列を決定し, 大腸菌の σ^{54} プロモーターを活性化するNtrCと高い相同性があることを明らかにし(25), およびシュードモナス・プチダにも σ^{54} 遺伝子*rpoN*が存在することをクローニングにより証明した(27)。さらに, OP1と*xylS*の-140構造がXylRの結合部位であり, -140領域とプロモーター領域の間隔が重要で, これらがDNAらせん周期と同調したとき転写が起こることを明らかにし, -140領域に結合したXylRは, キシレンによって活性化され, -24, -12プロモータ配列に結合した σ^{54} -RNAポリメラーゼと相互作用を営み転写が開始されるというDNAループ説を提唱した(図1)(12, 17)。

ところで, XylSと*m*-トルイル酸によるOP2の活性化におけるXylRの役割はなにであろうか(20)。われわれはXylSを過剰生産させるとXylRの要求性がなくなることを見出し, XylRが*xylS*の転写を活性化し, その結果大量に産生されたXylSがOP2を活性化するというカスケード機構を提唱した(26)。すなわち, 図1に示すように, 2つの調節遺伝子が関与するキシレン分解系遺伝子オペロンの発現は, 構成的に産生されるXylRが基質であるキシレンと共同してOP1を活性化し, 同時に*xylS*のプロモーターを活性化する第1段階と, キシレンが第1オペロ

図1. (A) シュードモナス・ブチダのキシレン分解系の転写調節機構。構成的に合成された XylR が, キシレン存在下に *OP1* と *Ps* (*xyIS* プロモーター) を活性化する。これによりキシレンがトルイル酸にまで分解され, 同時に XylS がトルイル酸存在下で *OP2* を活性化し, トルイル酸を完全分解する。*OP1* と *Ps* は σ^{54} -RNA ポリメラーゼによって転写され, 一方 *xyIR* のプロモーター (*Pr*) および *OP2* は σ^{70} -RNA ポリメラーゼによって転写される。

(B) *OP1*, *Ps* プロモーター活性化のループモデル (17)。-170 から -130 の領域は XylR の結合部位で, 上流調節配列 (URS) とよぶ。XylR は, キシレンにより活性化され, プロモーターに結合した σ^{54} (RpoN)-RNA ポリメラーゼと相互作用を営む。その結果転写が開始される。

ンの酵素群によってトルイル酸にまで分解され, それが XylS と共同して *OP2* を活性化し, トルイル酸を完全分解するというカスケード機構によって調節される (50, 64)。*xyIR* と *xyIS* は逆方向に転写され, *xyIS* プロモーターの XylR 結合配列と *xyIR* のプロモーター領域が重なっている。このような構造をもつことにより, *xyIS* の -140 領域に結合した XylR がキシレンによって活性化されて *xyIS* の転写が進行しているときは, *xyIR* 自身の転写は抑制されている。 σ^{54} -RNA ポリメ

ラーゼに依存したこれら遺伝子の転写調節機構は, キシレンなど細胞膜を通過できる有害な芳香族炭化水素の襲撃に対処し, これを分解して栄養とするために発達した土壌細菌の環境適応機構であると考えられる。

5) TOL プラスミドと環境浄化

農薬, 洗剤, 産業廃棄物などの化学合成品に含まれる難分解性有機物を分解する能力をもつ微生物を分離し, 遺伝子工学によって改良して環境浄化に役立つ微生物を育種する試みが世界中で行わ

れている。1956年に大阪大学の細川桂一により分離されたシュードモナス・プチダ mt-2 は、早石研究室で酸素添加酵素の研究に用いられるとともに、米国を経由してヨーロッパにもたらされた。分子遺伝学の時代を迎え、日本と英国ではじまった TOL プラスミドの研究は、スイス、スペイン、ドイツへと広がり、分解プラスミドのプロトタイプとして環境浄化の研究に役立っている。われわれは TOL プラスミドを用いたプロモーター検索用ベクターの作成、構成的高発現プロモーターの同定と高発現ベクターの作成、シュードモナス属細菌の宿主・ベクター系の確立などを行った (15, 53, 92)。また他の研究室と共同で C230 大量産生菌の作成、環境中の芳香族炭化水素計測用プラスミドの開発も行った (14, 33)。なお、*xyIE* をレポーターとする遺伝子解析法は現在も広く用いられている。

1984年に米国の I. C. Gunsalus は、シュードモナス属細菌を環境浄化と病原性の両面から取り上げて議論するための国際シンポジウムを提唱し、1986年から隔年に開催されることになった。私は1995年につくばで開催された第5回シンポジウムの組織委員長をつとめた (56)。また私は、シュードモナス・セパシア (パークホルデリア・セパシア) や緑膿菌についても研究した (1, 2, 3, 7, 13, 41, 55, 66, 70, 76, 83, 86, 90, 91, 95, 96)。

3. ヘリコバクター・ピロリの持続感染機構の研究

1) ヘリコバクター・ピロリ研究の背景

オーストラリアの病理学者 Warren は、らせん菌が多形核白血球浸潤を伴った慢性活動性胃炎と関連していることに注目し、内科医 Marshall と共同でこの細菌の分離培養に成功した。かれらはらせん菌が胃炎と潰瘍の原因菌である可能性を示唆したが、この説は容易には受け入れられなかった。当時消化性潰瘍は、 H_2 レセプター拮抗剤 (H_2 ブロッカー) で酸分泌を抑制することで安全かつ有効に治療できる疾患であると認められており、細菌の関与を考える余地はないように思われた。「Koch の原則を満足するのか」との批判に対してボランティアによる急性胃炎の証明がなさ

れ、次いで除菌による潰瘍の再発防止症例が多数報告されてこの細菌重要性が認識されるようになった。当初 *Campylobacter* 属に分類されていたが、1989年 Goodwin により新しい属 *Helicobacter* が提唱され、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) となった。1994年に米国の NIH コンセンサス会議で「ヘリコバクター・ピロリ感染潰瘍患者は、酸分泌抑制剤投与の後に抗菌剤による除菌療法をするべきである」との統一見解が発表され、続いて WHO/IARC がヘリコバクター・ピロリをタバコと同じレベルの発がん性物質であると認定した。1996年にはヨーロッパのヘリコバクター・ピロリ感染症研究グループが、オランダの Maastricht における国際会議において、除菌すべき対象疾患を MALT リンパ腫、有症性慢性胃炎、胃癌切除後胃にまで拡大することを提唱した。わが国では2000年11月に、消化性潰瘍に限りヘリコバクター・ピロリの感染診断と除菌治療の保険診療が認可され、遅ればせながら除菌治療が開始された。

この間に基礎的な研究も大いに進展した。はじめに述べたように、1997年にヘリコバクター・ピロリ26695株の全ゲノム配列が決定され、1999年には J99 株の全ゲノム配列も報告された。また疫学的な研究により、世界人口の約30%がヘリコバクター・ピロリに感染していること、感染は主に小児期に起こること、感染の自然消滅はまれで、除菌しなければ一生感染が持続することなどが明らかにされている。

2) ヘリコバクター・ピロリとの出会いと初期の研究

私は1987年2月に山口大学医学部微生物学講座の教授に任命され、5年間勤めた山口大学医療技術短期大学部をあとにした。その頃、内科学第1講座の竹本忠良 (山口大学名誉教授) から、胃に棲んでいる細菌の研究をしたいと協力を求められた。胃の環境では細菌は棲めないと思っていた私はこの申し出に非常に困惑した。ところがこの時すでに欧米では、胃・十二指腸疾患は感染症か? をめぐって大論争が繰り広げられていたのである。

ヘリコバクター・ピロリ感染者は組織学的には炎症像を認めるが、胃・十二指腸症状を訴える患

者は少ない。そこで症状と細菌数とに相関があるかどうかを調べるため、生化学実験で用いる Potter のホモジナイザーで胃生検材料を無菌的にすりつぶす方法を考案し、胃疾患と細菌数との関係をはじめて報告した (38, 39, 77)。一方教室の小西久典 (小西耳鼻科医院) らは電子顕微鏡観察により、胃粘膜への接着様式に2種類あること、らせん菌体の方向が右巻きであること、鞭毛の鞘は細菌外膜と連続していることを明らかにした (35, 36)。また接着因子の研究 (65) や培養上清中の細胞空胞化毒素の研究も行った (37, 43)。

1991年、内科学第1講座の荻田幹夫 (防府温泉病院) はヌードマウス感染モデルの作成に成功した (28, 31)。シリコンチューブを用いてヘリコバクター・ピロリ菌液をマウスの胃に投与して定期間飼育後、胃を摘出して生理食塩水で軽く洗浄、縦分割し、その1片を病理組織検査に他片をヘリコバクター・ピロリの培養に用いた。その結果4週から10週にかけて菌数が増大し、20週後でも細菌の定着が認められた。感染胃では、粘膜下層の炎症細胞浸潤と局所的粘膜剥離 (糜爛) を認めたが、潰瘍の所見は認められなかった。この感染モデルは除菌治療の検討に用いられた (29, 30)。

3) 胃内定着におけるウレアーゼの働き

ヘリコバクター・ピロリは血液を含んだ栄養豊富な培地で4日間微好気培養を行うとようやく微小単個集落を認める。したがって大腸菌やシェドモナスで用いられる遺伝子解析法をヘリコバクター・ピロリに適用することはできない。津田雅孝 (東北大学大学院) は受容菌に供与菌 DNA と相同の配列があれば、形質転換による部位特異的変異菌の作成が可能であることを報告した (89)。

ヘリコバクター・ピロリは強いウレアーゼ活性を示すことが知られている。ウレアーゼは尿素からアンモニアを産生し、これが胃酸を中和するはたらきをもつと考えられていたが、部位特異的変異菌を用いた証明はなかった。この頃フランスの Labigne のグループおよび米国の Mobley のグループが、ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼ遺伝子群のクローニングと構造解析を報告し、ク

レブシエラのウレアーゼとの相同性から、構造遺伝子群 (*ureA*, *ureB*) とアクセサリー遺伝子群 (*ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH*) の2つのオペロンから成ることを提唱した。津田らは Mobley から分与されたプラスミドを用い、*ureB* に *kan* 遺伝子を挿入したプラスミドを作成した。これを形質転換することでウレアーゼ遺伝子破壊株の分離に成功し、これを用いたヌードマウス感染実験でウレアーゼが胃内定着に必須であることを証明した (88)。

兵庫医科大学の長田久美子らは、胃粘膜のプロトンポンプを特異的に阻害するランソプラゾールがヘリコバクター・ピロリに殺菌的に働くことを見出していた。われわれのウレアーゼ欠損変異株を用いることにより、この殺菌作用にウレアーゼは関与しないことを示した (44)。

4) 尿素走化性

ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼが酸中和に働くためには基質である尿素が必要である (87)。はたして胃の中には胃酸を中和するために十分な尿素が存在するのだろうか。そもそもヘリコバクター・ピロリは尿素をどのようにして得ているのであろうか。尿素は肝臓で合成され、血液中に排出されて体内を循環し、腎臓から排泄される。したがって血中には絶えず一定量の尿素が存在する。尿素は胃粘膜下の動静脈吻合部から胃粘膜下へ滲出し、胃粘膜細胞間隙を通り胃粘液層へ分泌され则认为られる。そうであれば、尿素は粘膜表層に高濃度存在するはずである。ヘリコバクター・ピロリは尿素を得るために粘膜表層に向かって泳ぐのではないだろうか。これをたしかめるため、エナメル被覆された10穴のスライドガラスの2つの穴の間に細い溝を堀り、それを少量の緩衝液で満した。一つの穴にヘリコバクター・ピロリ浮遊液を、他の穴には薄い尿素溶液を入れ、全体をカバーガラスで覆った。2つの穴を連結した溝を顕微鏡下で観察すると、細菌が尿素溶液に向かって泳ぐ像が観察された。

尿素走化性を定量化するため溝手朝子 (山口県立大学) は、Adler の毛細管法に準じた測定法を開発した。両端を閉じてく字に折り曲げた毛細管をスライドガラス上に置き、その上にカバーガラスを置くと、片方が開いた小さいチャンバーが

できる。ここに菌液を入れ、そこに一端を盲端にし尿素溶液を入れた 1 μ l の毛細管を挿入すると、毛細管に細菌が取り込まれる。グラム染色により、取り込まれた菌数を測定した。その結果、ヘリコバクター・ピロリは 10 mM の尿素溶液を含む毛細管に最もよく移行すること、走化性は尿素の構造類似体であるフルオロフェミドに対しても見られること、炭酸水素ナトリウムやいくつかのアミノ酸も誘引物質となること、およびウレアーゼ欠損変異株でも走化性が認められることが明らかとなった (42, 99)。

5) 運動性とウレアーゼ

ヘリコバクター・ピロリは圧倒的多数が胃粘液中に存在し、粘膜に接着している細菌は 2-3 % に過ぎない。また粘液層には絶えず新しい粘液が分泌され、古い粘液と置きかわっている。そこでヘリコバクター・ピロリが長期間生存するためには粘液中での移動が不可欠であろう。

吉山裕規 (北海道大学大学院)、中村弘毅らは粘液中でのヘリコバクター・ピロリの走化性を研究し、粘液中では運動性が亢進すること、それにはウレアーゼ活性が必要であること、鞭毛モーター駆動はプロトン濃度勾配に依存することを明らかにした (49, 100)。また胃粘膜防御剤やプロトンポンプ阻害剤がヘリコバクター・ピロリの運動を抑制することも明らかにした (101)。

粘液中での運動におけるウレアーゼの働きについて次のように考えられた。すなわち、細胞内ウレアーゼにより尿素から生成されたアンモニアが、鞭毛モーターの回転のために細胞外から流入したプロトンと反応してアンモニウムイオンとなるため、細胞膜電位が維持され、鞭毛モーターの回転運動が持続する。水溶液中では回転にかかる負荷は少ないが、粘液中ではそれが大きいので、プロトンのトラップがなければ運動は停止するであろう。(102)。なお、ヘリコバクター・ピロリのゲノム配列には走化性のセンサーとして働く 2 つのメチル化走化性蛋白遺伝子があり、それらが尿素走化性に関与する可能性がある。

6) ウレアーゼの調節機構

ヒトの胃粘液層の状態を考えてみよう。胃粘膜細胞は、自らを胃酸による攻撃から守るために炭酸水素ナトリウムを分泌するので、粘膜細胞直上

のわずかな範囲は中性が保たれている。それより内腔側 (ヘリコバクター・ピロリはほとんどがここに棲んでいる) は、食事ごとに繰り返される酸と粘液の分泌と蠕動運動、2-3 日周期で起こる胃粘膜細胞の新生などにより非常に大きく変動する。このような環境で数十年間も生存を続けるヘリコバクター・ピロリは、環境応答機能、とりわけ耐酸機構が発達しているはずである。他の研究者により、ウレアーゼは菌体蛋白の 5 % 以上も大量に産生されているが、その遺伝子の発現は酸による調節を受けず、構成的発現であると報告されていた。

当時の議論は、ウレアーゼ遺伝子群の塩基配列に基づいたもので、オペロン構造やプロモーターに関する実験的根拠は乏しかった。私はシュードモナス・プチダの経験から、転写開始点の決定と mRNA の同定がウレアーゼの発現調節研究の鍵であると考えた。白井睦訓 (山口大学医学部)、赤田純子 (米国セントルイス、ワシントン大学) らは *ureA* と *ureI* 上流の転写開始点を決定し、*ureI* プロモーターは典型的な -35, -10 コンセンサス配列を持つが、*ureA* プロモーターはそれと異なることを明らかにした (6, 79)。さらに白井睦訓らは、ヘリコバクター・ピロリと大腸菌の各種 *rpoD* ハイブリッドを *rpoD* 欠損大腸菌で解析し、大腸菌の *rpoD* の -35 認識領域をヘリコバクター・ピロリの *rpoD* 配列に置換すると、コンセンサスプロモーターよりも *ureA* プロモーターをより強く認識することを示した (79)。また、竹内啓晃 (米国バンダービルト大学) らはウレアーゼオペロンの下流領域を解析し、細胞分裂に関与する新規遺伝子 *cdrA* を発見した (84, 85)。

赤田純子らは中性と酸性培養菌のウレアーゼ遺伝子群の転写産物を解析した。*ureAB* オペロンの mRNA は大量に得られ、*ureA* プロモーターが強力なプロモーターであることがわかったが、中性培養菌の、特にアクセサリー遺伝子群 *ureIEFGH* の mRNA は、量的に少ないのみでなく長さが短く、*ureIE'* (*ureI* から *ureE* の一部まで) と *ureGH* の mRNA が検出されるのみであった。*ureG* の上流 (*ureF* の中) からの転写開始も考えられたが、アポ酵素の活性化に共同して働

くと考えられる遺伝子群が別々に転写されるのは不合理である。そこで mRNA 分解の可能性を考えた。これまで転写開始段階での調節ばかりを注目していたが、ウレアーゼには転写後調節があるのではないだろうか。1990年に入り大腸菌や枯草菌では mRNA 分解による遺伝子発現調節機構の報告が見られるようになっていた。そこで mRNA 分解を仮定してウレアーゼ遺伝子のノーザンブロットのデータを見直すと、すべてのデータは矛盾なく説明できた。

さらに詳細な解析により、初期転写産物は *ureAB*, *ureIEFGH*, *ureABIEFGH* の mRNA 3 種類であり、*ureAB* と *ureIEFGH* オペロンの下流にはそれぞれ転写終結のためのパリンδροーム構造があること、*ureE* と *ureF* 内にはいくつかのパリンδροーム構造があり、mRNA はおそらくその部位で RNA エンドヌクレアーゼにより特異的に切断され、ついで RNA エキシヌクレアーゼにより 3' から 5' への分解がおこると考えられること、酸性ではこの分解が抑制されることがわかった (図2) (6)。また、*ureAB* と *ureIEFGH* の転写は中性で速やかに起こるが分解も早いいため転写産物が少量しか検出されないこと、酸性では合成も分解も遅いこと、および中性培養菌は酸性

培養菌に比べてウレアーゼの比活性が低いこともわかった。なおヘリコバクター・ピロリのゲノムには、mRNA 分解調節に関与する遺伝子として *rnc* (RNaseIII), *pnp* (ポリヌクレオチドホスホリラーゼ), *deaD* (DNA ヘリカーゼ), *papS* (ポリ A ポリメラーゼ) の存在が認められた。

アクセサリー遺伝子産物のなかで、UreE と UreF はウレアーゼのアポ酵素活性化の最終段階で働く。すなわち UreE は Ni イオンを酵素リガンドに運搬する分子シャペロンであり、一方 UreF は酵素に結合し、活性化の中間段階であるリジン残基のカルボニル化が完了するまで活性中心への Ni イオンの結合を防いでいる。そこで中性で UreE と UreF をもたないヘリコバクター・ピロリは、不活性なウレアーゼを産生するが、酸性環境では活性ウレアーゼを持つことになる。細菌が増殖できる中性の胃粘膜表層では尿素が大量に存在するため、強いウレアーゼ活性は過剰のアンモニア産生を導き有害である。一方内腔側の酸性環境では、細菌の増殖はできないが活性ウレアーゼが必要である。われわれが明らかにした mRNA 分解によるヘリコバクター・ピロリのウレアーゼ発現調節は、胃粘液層の急激な pH 変化に適応して生存するヘリコバクター・ピロリが獲

図2. ウレアーゼオペロンの構造と mRNA 分解による活性化調節。ウレアーゼオペロンは *ureAB*, *ureIEFGH* からなる。初期転写産物は *ureAB*, *ureABIEFGH*, *ureIEFGH* である。これらは中性で RNA エンドヌクレアーゼ (RNase) によって速やかに分解されるが、酸性では分解が起こらない。中性では mRNA 分解の結果 UreE と UreF ができないので、酵素の活性化が起こらない。

図3. 胃粘液層におけるヘリコバクター・ピロリのライフサイクルのモデル。ヘリコバクター・ピロリは酸性環境では活性ウレアーゼを産生して耐酸性と運動性を示し、尿素走化性によって胃粘膜表層へ到達する。表層は重炭酸イオンの分泌により中性に近く、粘膜細胞回転によりアミノ酸が供給されるので分裂することができる。しかしウレアーゼの活性化は抑制されている。分裂した細菌は粘液層の移動によって内腔側および十二指腸へと流されるが、走化性によって再び粘膜表層に戻ることができ、胃内に長期間とどまる。

得したユニークな耐酸性機構ではないだろうか(4)。

最近ウレアーゼの基質である尿素の取り込みに関して、米国の Sachs らが興味ある報告をしている。すなわちアクセサリー遺伝子オペロンの第1遺伝子である *ureI* をアフリカツメガエルの卵母細胞に導入し、その産物が酸性で開き中性で閉じる尿素チャンネルであることを示した。これにより菌体内に取り込まれた尿素は、ウレアーゼによって分解され、生じるアンモニアが細胞膜を通過してペリプラスムに出て環境の胃酸を中和することから、チャンネルを介さなくても細菌細胞にとりこまれると考えられる。事実 Sachs らの卵母細胞の系で、中性でもかなりの量の尿素が取り込まれることが示唆されている。そこで、前述の中性でウレアーゼ活性を抑制する機構の存在が重要だと考えられる。

7) ヘリコバクター・ピロリの RpoN のはたらき

ヘリコバクター・ピロリのゲノム配列が公開されて驚いたことは、転写調節に関わる遺伝子が極めて少ないことである。とくに RNA ポリメラー

ゼの σ サブユニットは、RpoD, RpoN, RpoF の3種類しか存在しない。しかも全遺伝子 ORF のプロモーター領域を検索すると、 σ^{54} -RNA ポリメラーゼ特異的な GG(-24), GC(-12) コンセンサス配列を持つ遺伝子はわずか5ヶしかない。それらは鞭毛繊維 (FlaB), 鞭毛フック (FlgE) その他鞭毛構築に関係する遺伝子であることから、RpoN は鞭毛構築に関係することが予測された。藤永竜太郎 (山口大学医学部) らは *rpoN* 破壊変異菌を分離することに成功した (11)。この変異菌は鞭毛形成に欠損が見られるだけでなく、長期培養により死滅する形質を示し、RpoN が運動性と同時に長期生存にも関わることが明らかとなった。

8) ヘリコバクター・ピロリの持続感染機構

図3にヘリコバクター・ピロリの持続感染機構に関する私の考えをまとめた。ヘリコバクター・ピロリは、経口感染で胃内に入り、ウレアーゼにより酸性環境に抵抗し、運動性と尿素走化性によって胃粘液層に潜り、胃粘膜上皮細胞表層に到着する。粘膜細胞表層では、粘液分泌細胞の崩壊と新生が絶えず起こっており、アミノ酸やビタミンなどの栄養分が豊富にある。アミノ酸分解系を

持つヘリコバクター・ピロリは、ここで主としてアミノ酸を利用して増殖する。細胞表層の pH は中性で細菌の増殖に適している。分裂した細菌は粘液層の移動とともに酸性環境に曝される。そこでウレアーゼの活性化がおこり、同時に UreI チャンネルが開口して尿素をとりこみ、アンモニアが産生され、細菌環境が中和される。粘液層の細菌は蠕動運動により十二指腸側へ流されるが、尿素走化性によって再び細胞表層へ回帰することができる。このような粘液層におけるヘリコバクター・ピロリの増殖サイクルが胃内持続感染を可能にしていると考えられる。

最近ヘリコバクター・ピロリの類縁菌であるキャンピロバクター・ジェジュニの全ゲノム配列が報告された。興味あることに、アミノ酸代謝ならびに窒素代謝に関わる遺伝子が大きく異なる。すなわち、ヘリコバクター・ピロリは、胃酸中和のためのウレアーゼ遺伝子のみならず、胃に定着しアミノ酸やペプチドを取り込み分解して栄養とするための代謝系をもつが、腸管に定着するキャンピロバクター・ジェジュニはこれらの代謝系をもたず、大腸菌などと同様にすべてのアミノ酸を生合成し、おそらく糖を栄養源としていると考えられる (54)。

私はヘリコバクター・ピロリの感染経路についても研究を行った。嫌気性における球状体形成がポリリン酸顆粒の蓄積を伴った変化であることを明らかにし (80)、胃内でらせん菌として存在していたヘリコバクター・ピロリが、嫌気性の腸管内腔でエネルギーを保持した球状体に変化し、それが感染源となる可能性を示した。また、マウス感染モデルにより、ヘリコバクター・ピロリの糞口感染を証明した (98)。

おわりに

ヘリコバクター・ピロリが分泌する細胞空胞化毒素 VacA はアポトーシスを惹起し細胞崩壊を促進すると考えられている。また IV 型分泌系として知られる CagPAI は、細胞に IL8 産生誘導や細胞骨格蛋白の重合化を惹起し細胞を障害する。これらが潰瘍の発症や発癌にどのように関与するのかは明らかでないが、ヘリコバクター・ピロリの持続感染はこれらの病原因子が働く前提条

件である。一方わが国でも除菌治療が始まったが、使用できる薬剤が限られているため、耐性菌の出現により除菌治療が困難になっている。われわれも新しい抗生剤の開発に協力してきたが (5)、抗生剤以外の薬剤によるヘリコバクター・ピロリ感染症の治療薬を開発することも必要である。本論文が今後の研究にヒントを与え、新しい治療薬の開発の一助となれば幸甚である。

謝 辞

このたびは細菌学会浅川賞受賞の栄に浴したが、このことはもとより私一人の力によるものではない。ピロリ菌という大変興味ある研究対象に出会い、生化学を基礎とした細菌学的研究を展開することができたのは、偏に優れた指導者と共同研究者に恵まれたお陰である。心から感謝の意を表したい。中で共同研究者の敬称を省略したことをお許しいただきたい。

終わりにあたり、日本細菌学会理事長の筑波大学林 英生教授、推薦者の岡山大学小熊恵二教授、学会賞選考委員各位、ならびに北里研究所に深く感謝します。さらに受賞講演の機会をいただいた第74回日本細菌学会総会長の岡山大学篠田純男教授に感謝します。

文 献

- 1) Abe, M., Nakazawa, T. (1994): Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalycin, from *Pseudomonas cepacia*. Microbiol. Immun. **38**, 1-9.
- 2) Abe, M., Nakazawa, T. (1996): The *dsbB* gene product is required for protease production by *Burkholderia cepacia*. Infect. Immun. **64**, 4378-4380.
- 3) Abe, M., Tsuda, M., Kimoto, M., Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1996): A genetic analysis system of *Burkholderia cepacia*: construction of mobilizable transposons and a cloning vector. Gene **174**, 191-194.
- 4) 赤田純子, 中澤晶子 (2000): ウレアーゼ, p. 73-79, 下山 孝 (編), H. pylori 感染の基礎と臨床, 日本メディカルセンター, 東京.
- 5) Akada, J.K., Shirai, M., Fujii, K., Okita, K., Nakazawa, T. (1999): In vitro anti-*Helicobacter pylori* activities of new rifamycin derivatives,

- KRM-1648 and KRM-1657. Antimicrob. Agents Chemother. **43**, 1072–1076.
- 6) Akada, J., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M., Nakazawa, T. (2000): Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. Mol. Microbiol. **36**, 1071–1084.
 - 7) Bhat, M.A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C.S., Nakazawa, T. (1994): Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 307–312.
 - 8) Ebina, Y., Kishi, F., Miki, T., Kagamiyama, H., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1981): The nucleotide sequence surrounding the promoter region of colicin E1 gene. Gene, **15**, 119–126.
 - 9) Ebina, Y., Kishi, F., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1979): Gene expression in vitro of colicin E1 plasmid. Nucl. Acids Res. **7**, 639–649.
 - 10) Ebina, Y., Takahara, Y., Shirabe, K., Yamada, M., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1983): Plasmid-encoded regulation of colicin E1 gene expression. J. Bacteriol. **156**, 487–492.
 - 11) Fujinaga, R., Nakazawa, T., Shirai, M. (2001): Allelic exchange mutagenesis of *rpoN* encoding RNA-polymerase σ^{54} subunit in *Helicobacter pylori*. J. Infect. Chemother. 2001 (in press).
 - 12) Gomada, M., Inouye, S., Imaishi, H., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1992): Analysis of an upstream regulatory sequence required for activation of the regulatory gene *xylS* in xylene metabolism directed by the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. Mol. Gen. Genet., **233**, 419–426.
 - 13) Hayashi, S., Abe, M., Kimoto, M., Furukawa, S., Nakazawa, T. (2000): The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. Microbiol. Immun. **44**, 41–59.
 - 14) Ikariyama, Y., Nishigushi, S., Kobatake, E., Aizawa, M., Tsuda, M., Nakazawa, T. (1993): Luminescent biomonitoring of benzene derivatives in the environment using recombinant *Escherichia coli*. Sens. Actuat. B, **13–14**, 169–172.
 - 15) Inouye, S., Asai, Y., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1986): Nucleotide sequence of a DNA segment promoting transcription in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **166**, 739–745.
 - 16) Inouye, S., Ebina, Y., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1984): Nucleotide sequence surrounding transcription initiation site of *xylABC* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **81**, 1688–1691.
 - 17) Inouye, S., Gomada, M., Sangodkar, UMX, Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1990): Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XlyR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. J. Mol. Biol. **216**, 251–260.
 - 18) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1981): Molecular cloning of TOL genes *xylB* and *xylE* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **145**, 1137–1143.
 - 19) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1981): Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS*. J. Bacteriol. **148**, 413–418.
 - 20) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1983): Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid. J. Bacteriol. **155**, 1192–1199.
 - 21) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1984): Nucleotide sequence of the promoter region of the *xylDEGF* operon on TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. Gene **29**, 323–330.
 - 22) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1985): Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid. J. Bacteriol. **163**, 863–869.
 - 23) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1986): Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. Gene **44**, 235–242.
 - 24) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1987): Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **84**, 5182–5186.
 - 25) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1988): Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida*. Gene **66**, 301–306.
 - 26) Inouye, S., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1987): Overproduction of the *xylS* gene product and

- activation of the *xyIDLEGF* operon on the TOL plasmid. J. Bacteriol. **169**, 3587–3592.
- 27) Inouye, S., Yamada, M., Nakazawa, A., Nakazawa, T. (1989): Cloning and sequence analysis of the *ntxA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. Gene **85**, 145–152.
 - 28) Karita, M., Kouchiyama, T., Okita, K., Nakazawa, T. (1991): New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. Am. J. Gastroenterol. **86**, 1596–1603.
 - 29) Karita, M., Tada, M., Okita, K., Tsuda, M., Nakazawa, T. (1993): Evaluation of methylene blue and triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in the nude mouse model. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **5**, S79–S84.
 - 30) Karita, M., Tsuda, M., Okita, K., Sugiyama, T., Nakazawa, T. (1995): Evaluation of a new bismuth-free triple therapy in nude mice and humans. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **7**, S31–34.
 - 31) Karita, M., Kouchiyama, T., Tada, M., Okita, K., Nakazawa, T., Takemoto, T. (1992): Establishment of new small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **4**, S25–S29.
 - 32) Kishi, F., Ebina, Y., Miki, T., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1982): Purification and characterization of a protein from *Escherichia coli* which forms complexes with superhelical and single-stranded DNAs. J. Biochem. (Tokyo) **92**, 1059–1068.
 - 33) Kobayashi, T., Ishida, T., Horiike, K., Takahara, Y., Numao, N., Nakazawa, A., Nakazawa, T., Nozaki, M. (1995): Overexpression of *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase with high specific activity by genetically engineered *Escherichia coli*. J. Biochem. (Tokyo) **117**, 614–622.
 - 34) Kojima, Y., Fujisawa, H., Nakazawa, A., Nakazawa, T., Kanetsuna, F., Taniuchi, H., Nozaki, M., Hayaishi, O. (1967): Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties. J. Biol. Chem. **242**, 3270–3278.
 - 35) Konishi, H., Hirose, H., Nakazawa, T., Kouchiyama, T., Shigeeda, M., Takemoto, T. (1988): Electron microscopy of *Campylobacter pylori* in human gastric mucosa. The 1st Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases (Proceeding).
 - 36) Konishi, H., Ishibashi, M., Kimoto, M., Katayama, A., Nakazawa, T., Shigeeda, M., Kouchiyama, T., Tada, M., Takemoto, T. (1989): Spiral conformation of *Campylobacter pylori*. In The 2nd Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases (Proceeding).
 - 37) Konishi, H., Morshed, M.G., Nakazawa, T. (1992): Cytopathic effects of *Helicobacter pylori* on cultured mammalian cells. J. Med. Microbiol. **37**, 118–122.
 - 38) Kouchiyama, T., Tada, M., Shigeeda, M., Karita, M., Yanai, H., Kawano, H., Murakami, A., Okazaki, Y., Takemoto, T., Konishi, H., Nakazawa, T. (1989): Significance of *Campylobacter pylori* in chronic gastritis. In The 2nd Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases (Proceeding).
 - 39) Kouchiyama, T., Tada, M., Shigeeda, M., Yanai, H., Karita, M., Okazaki, Y., Takemoto, T., Konishi, H., Nakazawa, T. (1989): The quantitative study of *Campylobacter pylori* in disease of stomach. In The 2nd Tokyo International Symposium of *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases (Proceeding).
 - 40) Matsumoto, H., Nakazawa, T., Ohta, S., Terawaki, Y. (1981): Chromosomal locations of *catA*, *pobA*, *dcu* and *chu* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Genet. Res. (Cambridge) **38**, 251–266.
 - 41) Miyazaki, H., Kato, H., Nakazawa, T., Tsuda, M. (1995): A positive regulatory gene, *pvdS*, for expression of pyoverdine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Mol. Gen. Genet. **248**, 17–24.
 - 42) Mizote, T., Yoshiyama, H., Nakazawa, T. (1997): Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. Infect. Immun. **65**, 1519–1521.
 - 43) Morshed, M.G., Karita, M., Konishi, H., Okita, K., Nakazawa, T. (1994): Growth medium containing cyclodextrin and low concentration of horse serum for cultivation of *Helicobacter pylori*. Microbiol. Immun. **38**, 897–900.
 - 44) Nagata, K., Takagi, E., Tsuda, M., Nakazawa, T., Satoh, H., Nakao, M., Okamura, H., Tamura, T. (1995): Inhibitory action of lansoprazole and its analogs against *Helicobacter pylori*: inhibition of

- growth is not related to inhibition of urease. Antimicrob. Agents Chemother. **39**, 567-570.
- 45) Nakai, C., Hori, K., Kagamiyama, H., Nakazawa, T., Nozaki, M. (1983): Purification, subunit structure, and partial amino acid sequence of metapyrocatechase. J. Biol. Chem. **258**, 2916-2922.
 - 46) Nakai, C., Kagamiyama, H., Nozaki, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Ebina, Y., Nakazawa, A. (1983): Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Biol. Chem. **258**, 2923-2928.
 - 47) Nakai, C., Nakazawa, T., Nozaki, M. (1988): Purification and properties of catechol 1,2-dioxygenase (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 in comparison with that from *Pseudomonas arvilla* C-1. Arch. Biochem. Biophys. **267**, 701-713.
 - 48) Nakai, C., Uyeyama, H., Kagamiyama, H., Nakazawa, T., Inouye, S., Kishi, F., Nakazawa, A., Nozaki, M. (1995): Cloning, DNA sequencing, and amino acid sequencing of catechol 1,2-dioxygenases (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 and *Pseudomonas arvilla* C-1. Arch. Biochem. Biophys. **321**, 353-362.
 - 49) Nakamura, H., Yoshiyama, H., Takeuchi, H., Okita, K., Nakazawa, T. (1998): Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. Infect. Immun. **66**, 4832-4837.
 - 50) Nakazawa, A., Inouye, S., Gomada, M., Imaishi, H., Nakazawa, T. (1992): Upstream regulatory sequences for transcriptional activation of catabolic genes on the TOL plasmid. p. 251-260, In Galli, E., Silver, S., Witholt, B. (eds), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, ASM Press, Washington, D.C.
 - 51) Nakazawa, A., Nakazawa, T., Kotani, S., Nozaki, M., Hayaishi, O. (1969): Studies on pyrocatechase. III. Circular dichroism and optical rotatory dispersion. J. Biol. Chem. **244**, 1527-1532.
 - 52) Nakazawa, T. (1978): TOL plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: thermosensitivity of self-maintenance and inhibition of host cell growth. J. Bacteriol. **133**, 527-535.
 - 53) 中澤晶子 (1987): シュードモナス, p. 106-133, 安藤忠彦, 坂口健二 (編) 微生物学基礎講座 8 巻, 共立出版. 東京.
 - 54) 中澤晶子 (2001): ピロリ菌はなぜ胃に棲みつくとができるか. 蛋白質核酸酵素 **46**, 2025-2033.
 - 55) Nakazawa, T., Abe, M. (1996): Pathogenesis of *Burkholderia cepacia* and export of protease by the general secretory pathway involving disulfide bond formation in the periplasm. p. 462-471, In Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D., Silver, S. (eds), *Molecular Biology of Pseudomonads*, ASM Press, Washington, D.C.
 - 56) Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D., Silver, S. (eds) (1996): *Molecular Biology of Pseudomonads*, ASM Press, Washington, D.C.
 - 57) Nakazawa, T., Hayashi, E. (1977): Phthalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: accumulation of 4,5-dihydroxy-phthalate by a mutant strain. J. Bacteriol. **131**, 42-48.
 - 58) Nakazawa, T., Hayashi, E. (1978): Phthalate and 4-hydroxyphthalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: purification and properties of 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase. Appl. Environ. Microbiol. **36**, 264-269.
 - 59) Nakazawa, T., Hayashi, E., Yokota, T., Ebina, Y., Nakazawa, A. (1978): Isolation of TOL and RP4 recombinants by integrative suppression. J. Bacteriol. **134**, 270-277.
 - 60) Nakazawa, T., Hori, K., Hayaishi, O. (1972): Studies on monooxygenases. V. Manifestation of amino acid oxidase activity by L-lysine monooxygenase. J. Biol. Chem. **247**, 3439-3444.
 - 61) Nakazawa, T., Inouye, S. (1986): Cloning of *Pseudomonas* genes in *Escherichia coli*. p. 357-362, In Sokatch, J.R., and Ornston, L.N. (eds), *The Bacteria*, vol. X, Academic Press, New York.
 - 62) Nakazawa, T., Inouye, S., Nakazawa, A. (1980): Physical and functional mapping of RP4-TOL plasmid recombinants: analysis of insertion and deletion mutants. J. Bacteriol. **144**, 222-231.
 - 63) Nakazawa, T., Inouye, S., Nakazawa, A. (1985): Positive regulation and transcription initiation of *xyl* operons on TOL plasmid. Basic Life Sci. **30**, 415-429.
 - 64) Nakazawa, T., Inouye, S., Nakazawa, A. (1990): Regulatory systems for expression of *xyl* genes on the TOL plasmid. p. 133-140, In Silver, S., Chakrabarty, A., Iglewski, B., Kaplan, S., (eds), *Pseudomonads: Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology*, ASM Press, Washington, D.C.
 - 65) Nakazawa, T., Ishibashi, M., Konishi, H., Takemoto, T., Shigeeda, M., Kouchiyama, T.

- (1989): Hemagglutination activity of *Campylobacter pylori*. Infect. Immun. **57**, 989-991.
- 66) Nakazawa, T., Kimoto, M., Abe, M. (1990): Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *recA* gene of *Pseudomonas cepacia*. Gene **94**, 83-88.
- 67) Nakazawa, T., Kojima, Y., Fujisawa, H., Nozaki, M., Hayaishi O. (1965): Studies on the mechanism of action of pyrocatechase by electron spin resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. **240**, PC3225-3226.
- 68) Nakazawa, T., Kotani, S., Nozaki, M., Hayaishi, O., Yamano, T. (1969): Studies on pyrocatechase. II. Electron spin resonance and other properties of iron in the active center. J. Biol. Chem. **244**, 119-125.
- 69) Nakazawa, T., Simoni, R.D., Hays, J.B., Roseman, S. (1971): Phosphorylation of a sugar-specific protein component of the lactose transport system in *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **42**, 836-843.
- 70) Nakazawa, T., Yamada, Y., Ishibashi, M. (1987): Characterization of hemolysin in extracellular products of *Pseudomonas cepacia*. J. Clin. Microbiol. **25**, 195-198.
- 71) Nakazawa, T., Yokota, T. (1971): Requirement of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate for L-arabinose isomerase synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **113**, 1412-1418.
- 72) Nakazawa, T., Yokota, T. (1973): Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol. **115**, 262-267.
- 73) Nakazawa, T., Yokota, T. (1977): Isolation of mutant TOL plasmid with increased activity and transmissibility from *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2. J. Bacteriol. **129**, 39-46.
- 74) Nozaki, M., Ono, K., Nakazawa, T., Kotani, S., Hayaishi, O. (1968): Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups. J. Biol. Chem. **243**, 2682-2890.
- 75) Numa, S., Ishimura, Y., Nakazawa, T., Okazaki, T., Hayaishi, O. (1964): Enzymic studies on the metabolism of glutarate in *Pseudomonas*. J. Biol. Chem. **239**, 3915-3926.
- 76) Ouchi, K., Abe, M., Karita, M., Oguri, Y., Igari, J., Nakazawa, T. (1995): Analysis of strains of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolated in a nosocomial outbreak by biochemical and genomic typing. J. Clin. Microbiol. **33**, 2353-2357.
- 77) Shigeeda, M., Tada, M., Kouchiyama, T., Karita, M., Yanai, H., Kawano, H., Murakami, A., Okazaki, Y., Konishi, H., Nakazawa, T., Takemoto, T. (1988): The significance of *Campylobacter pylori* in peptic ulcer. In The 1st Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori* and Gastrointestinal Diseases (Proceeding).
- 78) Shirabe, K., Ebina, Y., Miki, T., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1985): Positive regulation of the colicin E1 gene by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. Nucl. Acids Res. **13**, 4687-4698.
- 79) Shirai, M., Fujinaga, R., Akada, J., Nakazawa, T. (1999): Activation of *Helicobacter pylori ureA* promoter by a hybrid *Escherichia coli*-*H. pylori rpoD* gene in *E. coli*. Gene **239**, 351-359.
- 80) Shirai, M., Akada, J., Shibata, K., Morshed, M.G., Matsushita, T., Nakazawa, T. (2000): Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. J. Med. Microbiol. **49**, 1-7.
- 81) Simoni, R.D., Nakazawa, T., Hays, J.B., Roseman, S. (1973): Sugar transport. IV. Isolation and characterization of the lactose phosphotransferase system in *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. **248**, 932-940.
- 82) Simoni, R.D., Hays, J.B., Nakazawa, T., Roseman, S. (1973): Sugar transport. VI. Phosphoryl transfer of the lactose phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. **248**, 957-965.
- 83) Takeo, Y., Oie, S., Kamiya, A., Konishi, H., Nakazawa, T. (1994): Efficacy of disinfectants against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios **79**, 19-26.
- 84) Takeuchi, H., Nakazawa, T. (2001): Chromosomal replication, plasmid replication, and cell division. p. 259-267, In Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Hazell, S.L. (eds), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics, ASM Press, Washington, D.C.
- 85) Takeuchi, H., Shirai, M., Akada, J.K., Tsuda, M., Nakazawa, T. (1998): Nucleotide sequence and characterization of *cdrA*, a cell division-related gene of *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. **180**, 5263-5268.
- 86) Takigawa, K., Fujita, J., Negayama, K., Yamagishi, Y., Ouchi, K., Yamada, K., Abe, M., Nakazawa, T., Kawanishi, K., Takahara, J. (1993): Nosocomial outbreak of *Pseudomonas*

- cepecia respiratory infection in immuno-compromised patients associated with contaminated nebulizer devices. *Jpn. J. Infect. Dis.* **67**, 1115–1125.
- 87) Tsuda, M., Karita, M., Mizote, T., Morshed, M.G., Okita, K., Nakazawa, T. (1994): Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, S49–52.
 - 88) Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., Nakazawa, T. (1994): A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* **62**, 3586–3589.
 - 89) Tsuda, M., Karita, M., Nakazawa, T. (1993): Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immun.* **37**, 85–89.
 - 90) Tsuda, M., Miyazaki, H., Nakazawa, T. (1995): Genetic and physical mapping of genes involved in pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **177**, 423–431.
 - 91) Tsuda, M., Nakazawa, T. (1993): A mutagenesis system utilizing a *Tn1772* derivative containing an *Escherichia coli*-specific vector plasmid: application to *Pseudomonas* species. *Gene* **136**, 257–262.
 - 92) 津田雅孝, 中澤晶子 (1993): *Pseudomonas* 属細菌の遺伝解析系, p. 127–128, 山田秀明, 別府輝彦, 深澤俊夫 (編), 微生物の機能開発, 学会出版センター, 東京.
 - 93) Watari, H., Nakazawa, T., Yamano, T. (1967): Studies on mechanism of inactivation of catechol 1,2-oxygenase by electron spin resonance. *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 409–416.
 - 94) Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1982): Nucleotide sequence of the structural gene for colicin E1 and predicted structure of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **79**, 2827–2831.
 - 95) Yamagishi, Y., Fujita, J., Takigawa, K., Negayama, K., Nakazawa, T., Takahara, J. (1993): Clinical features of *Pseudomonas cepacia* pneumonia in an epidemic among immuno-compromised patients. *Chest* **103**, 1706–1709.
 - 96) Yamagishi, Y., Fujita, J., Takigawa, K., Miyawaki, H., Takahara, J., Yamadori, I., Negayama, K., Fujimaki, K., Nakazawa, T. (1993): Experimental pneumonia produced by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia* in mice. *Jpn. J. Infect. Dis.* **67**, 816–822.
 - 97) Yamamoto, S., Nakazawa, T., Hayaishi, O. (1971): Studies on monooxygenases. IV. Anaerobic formation of an α -keto acid by L-lysine monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3434–3438.
 - 98) Yoshimatsu, T., Shirai, M., Nagata, K., Okita, K., Nakazawa, T. (2000): Transmission of *Helicobacter pylori* from challenged to non-challenged nude mice kept in a single cage. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1747–1753.
 - 99) Yoshiyama, H., Mizote, T., Nakamura, H., Okita, K., Nakazawa, T. (1998): Chemotaxis of *Helicobacter pylori*: a urease-independent response. *J. Gastroenterol.* **33** [Suppl X], 1–5.
 - 100) Yoshiyama, H., Nakamura, H., Kimoto, M., Okita, K., Nakazawa, T. (1999): Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J. Gastroenterol.* **34** (Suppl XI), 18–23.
 - 101) Yoshiyama, H., Nakamura, H., Okamoto, T., Okita, K., Nakazawa, T. (2000): A novel in vitro effect of the mucosal protective agent sofalcone—inhibition of chemotactic motility in *Helicobacter pylori*. *Alim. Pharm.* **14** (S 1), 230–236.
 - 102) Yoshiyama, H., Nakazawa, T. (2000): Unique Mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microb. Infect.* **1**, 1–6.